

318

JP06261766A

# MicroPatent Report

# GENETIC DNA CAPABLE OF CODING ASPARTOKINASE RELEASED FROM FEEDBACK INHIBITION AND ITS UTILIZATION



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261766

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
C 12 N 15/54 ZNA  
C 12 P 13/08 A 2121-4B  
// (C 12 N 15/54  
C 12 R 1:13)  
9050-4B C 12 N 15/ 00 A  
審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-55451

(22)出願日 平成5年(1993)3月16日

(71)出願人 000006057  
三菱油化株式会社  
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号  
(72)発明者 佐藤 幸江  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 巻野 信剛  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 小林 幹  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(74)代理人 弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及び  
(57)【要約】 その利用

【構成】 AEC耐性を有しつつL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ233から単離した、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【効果】 このフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233株は、L-リジンの生成量が顕著に増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 ブレビバクテリウム属細菌がブレビバク

テリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) MJ233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGCAGGA ACCGATTAGA 60  
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTTGTCTGC 120  
TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGCGGCAGT GAATCCCGTT 180  
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240  
GTCGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300  
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360  
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGCTTCCA GGGTGTCAAT 420  
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480  
TTGGCAGCTG CTCTGAACCG TGATGTTGT GAGATTTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTAC 540  
ACCGCTGACC CGCCCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600  
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660  
CGTGCATTCA ATGTGCCACT TCGCGTACCG TCCTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTG 720  
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTCGCAACC 780  
GACAAGTCGG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGRYTGC 840  
AAGGTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCTC TGACGGACGC 960  
CGTGCATGG AGATCTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTAC 1020  
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTCCACC 1140  
TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGACGTGCA 1200  
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGGAA GACGAAGCCG TCGTTATGC AGGCACCGGA 1260  
CGC 1263

(配列中、835番目のRはG又はAを示し、836番目、902番目および923番目のYはC又はTを示し、同時に、835番目のRがGであり、836番目、902番目および923番目のYがCであることはな

い。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
20 25 30  
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
85 90 95  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
100 105 110  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
115 120 125  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
130 135 140  
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

145	150	155	160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
180	185	190	
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
195	200	205	
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn			
210	215	220	
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr			
245	250	255	
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile			
260	265	270	
Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp			
275	280	285	
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu			
290	295	300	
Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg			
305	310	315	320
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr			
325	330	335	
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala			
340	345	350	
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu			
355	360	365	
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg			
370	375	380	
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala			
385	390	395	400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr			
405	410	415	
Ala Gly Thr Gly Arg			
420			

(配列中、279番目のAAAはAla又はThr又はValを示し、301番目のYYYはSer又はPheを示し、308番目のZZZはThr又はIleを示し、同時に、279番目のAAAがAlaであり、301番目のYYYがSerであり、308番目のZZZがThrであることはない。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E.C.2.7.2.4.)をコードする遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

### 【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている〔例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照〕。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている〔特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照〕。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】L-リジン生合成経路において、L-アスパラギン酸を初発とする第一ステップでアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)によりL-アスパラギン酸にリン酸が付加される。該アスパルトキナーゼは、最終生成物であるL-リジンにより阻害を受ける、即ちフィードバックインヒビションを受け、培地中にある濃度以上L-リジンを蓄積させることができない。このことが、微生物を用いるL-リジンの製造上の問題となっていた。

【0005】一方、アスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子としては、エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由來の遺伝子〔*Journal of Biological Chemistry*, 256, 10228~10230, 1981参照〕がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由來のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)としては、バチルス・サチルス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Coryneform glutamicum*)等が知られている〔*Journal of Biological Chemistry*, 262, 8787~8798, 1987; *Molecular Microbiology*, 5, 1197~1204, 1991参照〕。しかしながら、プレビバクテリウム属由來のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子については従来の報告例は見当らない。

【0006】本発明者等は、先にプレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)MJ233株染色体より、アスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見い出し提案した(特願平4-24658号明細書参照)。

### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレビバクテリウム属細菌由來のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点からさらに効率的にL-リジンを製造することである。

### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、S-(2-アミノエチル)-L-システィン(以下これを「AEC」と略称することがある)耐性を有するプレビバクテリウム属細菌染色体より、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAが単離可能であり、該遺伝子DNAを適當なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、さらに効率的にL-リジンを製造し得ることを見い出し本発明を完成するに至った。

### 【0009】

かくして本発明によれば、

- (1) プレビバクテリウム属細菌由來のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 後記配列表の配列番号6で示されるDNA塩基配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (3) 後記配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (4) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
- (5) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌; 及び
- (6) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0010】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、AECを含有するプレートに生育可能なコリネ型細菌のうち、リジンの生育量が増加した株の染色体より抽出したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA、すなわちL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0011】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコー

ドする遺伝子を含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はAEC耐性を有するアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、AEC耐性を有するブレビバクテリウム属細菌、特にAEC耐性を有するブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0012】すなわち、A断片の好適な供給源微生物としてはアスパルトキナーゼ生産性微生物を変異処理し、AEC耐性を有したL-リジンの生産性の増加した微生物が使用される。変異処理を行なう微生物としては、上記したブレビバクテリウム属細菌、特にブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0013】これらの微生物を変異処理してA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：先ず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン処理により変異を誘起せしめた後、この菌懸濁液をAEC 10 g/l 含有する平板培地〔尿素0.2%、硫安0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg/l、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 6 mg/l、ローピオチン 200 μg/l、チアミン塩酸塩 100 μg/l、寒天 20 g/l、グルコース 2%（滅菌後添加）〕に塗抹し、し、30°Cにて3日間培養し、生じたコロニーを分離することにより、AECに耐性を有する変異株ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233を得ることができる。

【0014】上記のようにして得られた変異株を好気的に培養して、培地中に生成蓄積するL-リジンの含量が親株より増加しているものをさらに選抜することにより、AEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ 233を取得することができる。かくして得られるA断片の供給源となる微生物の好適具体例として以下の菌株を挙げることができる。

【0015】ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233-Leu-AEC-Lys 163 (FERM P-13512)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 84 (FERM P-13511)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 242 (FERMP-13513)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 40 (FERM P-16510)。

【0016】これら変異株の菌学的性質は、AEC耐性

およびL-リジン生産性增加を除いては、親株であるブレビバクテリウム・フラバムMJ 233と同様である（菌学的性質については、特開昭51-130592号公報参照）。次に、上記したAEC耐性を有し、かつL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ 233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0017】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌（エシエリヒア・コリ）変異株CGSC5074（エシエリヒア・コリ ジエネティック・ストックセンター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University) ; P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株] を形質転換し、AECを含有する選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。

【0018】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ 233株染色体由來のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、これを前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、AECを含有する選択培地に塗抹する。

【0019】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ 233株染色体由來のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記AEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ 233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0020】この約1.7 kbのL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に、制限酵素による切断点地図を図1にそ

れぞれ示す。

【0021】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Pvu II	3	0.1, 0.2, 0.7, 0.7
Dra I	1	0.2, 1.5
Hinc II	2	0.3, 0.6, 0.7
Hind III	1	0.4, 1.2
Bgl II	2	0.5, 0.6, 0.6
Pst I	2	0.4, 0.6, 0.7
Nco I	1	0.5, 1.2
Xba I	1	0.4, 1.3

【0022】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0023】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素 Hind III で切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$  X174 phage) のDNAを制限酵素 Hae III で切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0024】一方、上記のAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ233の染色体DNAを制限酵素 Nru I および Eco RI によって切断することにより得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミド pUC118 または pUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法, Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したL-リジンによる

【表1】

フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号2～5に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0025】なお、後記配列表の配列番号1に、比較对照としてAECを含有しない選択培地を用いた他は同様の方法で単離・配列を決定したプレビバクテリウム・フラバムMJ233染色体由来のアスパルトキナーゼ遺伝子(以下これを「野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子」ということがある。)DNAの配列を示す。また、配列番号2に前記MJ233-Leu-AEC-Lys163株より得られた配列、配列番号3にMJ233-AEC-Lys84株より得られた配列、配列番号4にMJ233-AEC-Lys242株より得られた配列、配列番号5にMJ233-AEC-Lys40株より得られた配列をそれぞれ示す。

【0026】後記配列表の配列番号1～5に示される配列から明らかなどおり、L-リジンによりフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子DNAと比較して、835番目、836番目、902番目、923番目の塩基がそれぞれGからA、CからT、CからTに変異することによって、279番目、279番目、301番目、308番目のアミノ酸がそれぞれAlaからThr、AlaからVal、SerからPhe、ThrからIleに変化したものである。

【0027】また、逆に、この配列をもとにして、サイトダイレクトミュータジェネシス (Site-directed mutagenesis法, Kramer, W. et al. Nucl. Acids Res., 12, p9441, 1984) を用いて人为的に変異を導入することによっても、AEC耐性を付与する変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を得ることができる。

【0028】これらの結果から、本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号6に示される塩基配列又は配列番号7に示されるアミノ配

列で表されるDNAであることが判明した。上記の塩基配列を包含する本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のAEC耐性を有するブレビバクテリウム属細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0029】また、前記の如くAEC耐性を有するブレビバクテリウム・フラバムM J 233変異株の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0030】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適當なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0031】また、本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0032】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG

11等を挙げることができる。

【0033】中でもコリネ型細菌の宿主一ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0034】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレビバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XbaIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「複製機能領域」と言うことがある。）を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「安定化機能領域」と言うことがある。）を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0035】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適當なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0036】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AK835と命名した。プラスミドpCRY30-AK835の作成方法の詳細については、後記実施例5で説明する。

【0037】このようにして造成されるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが

可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ 233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-A B-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0038】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0039】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0040】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ 233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に消失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0041】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ 233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) もしくはエチジウムプロミド(濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 等を含む培地に、1 ml当り約10細胞になるように植菌し、生

育を不完全に阻害しながら約24時間約35°Cで培養する。培養液を希釀後寒天培地に塗布し、約35°Cで約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ 233由来菌株が得られる。

【0042】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ 233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られている様に [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0043】上記の方法で形質転換して得られるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスバルトキナーゼ産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ 233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、瓈糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカ、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0044】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40°C、好ましくは約25°C~約35°Cの温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができます、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができます、最適期間は3日間である。

【0045】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破碎物、さらに

それから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破碎物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20～約40℃、特に約25～約35℃において行なうことができる。

【0047】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

#### 【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

##### 参考例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

##### 【0049】(A) プレビバクテリウム・フラバムMJ233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4$  4～6 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレビバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

##### 【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレビバクテリウム・フラバムMJ233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

##### 【0051】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC5074(trr A1101, lys C1001, met L1000)である〔( )内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(Genotype)を示す〕。

【0052】上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解)に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

##### 【0054】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A)断片のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するため、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0055】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合

させた。

【0056】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリ CGSC 5074 株を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地 [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, グルコース 20 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 リットルに溶解] に塗抹した。

【0057】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を

用いて調べたところ、プラスミド pUC119 の長さ 3. 2 kb の DNA 断片に加え、長さ約 1. 7 kb の挿入 DNA 断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約 1. 7 kb の DNA 断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表 1 に示したものと同様であり、この DNA 断片の制限酵素切断点地図も図 1 に示したものと同様であった。

【0058】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表 2 に示す。

【0059】

【表 2】

制限酵素	認識部位数	プラスミド pUC119-AK
BamH I	1	4. 9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3. 6, 1. 2

【0060】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pUC119-AK と命名した。以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約 1. 7 kb の DNA 断片 (NruI-EcoRI 断片) を得ることができた。

【0061】参考例 2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 の (D) 項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約 1. 7 kb の DNA 断片について、その塩基配列をプラスミド pUC118 または pUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図 2 に示した戦略図に従って決定した。

【0062】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する 421 個のアミノ酸をコードする 1263 の塩基対より構成されていることが判明した。

【0063】参考例 3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクター pCRY30 の作成

(A) プラスミド pBY503 の調製

プラスミド pBY503 は、プレビバクテリウム・スタチオニス IF012144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約 10 メガダルトンのプラスミドであり、特開平 1-95785 号公報に記載のようにして調製した。

【0064】半合成培地 A 培地 [尿素 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4. 0. 5 g, MgSO<sub>4</sub> 0. 5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg, MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 6 mg, 酵母エキス 2. 5 g, カザミノ酸 5 g, ピチオン 200 μg, 塩酸チアミン 200 μg, グルコース 20 g 及び蒸留水 1 リットル] 1 リットルに、プレビバクテリウム・スタチオニス IF012144 を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/m<sup>l</sup> の濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM EDTA、50 mM グルコース] 20 m<sup>l</sup> に懸濁し、37°C で 1 時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS 液 (0. 2 N NaOH, 1% (W/V) SDS) 40 m<sup>l</sup> を添加し、緩やかに混和して室温にて 15 分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M 酢酸カリウム溶液 60 m<sup>l</sup>、酢酸 11. 5 m<sup>l</sup>、蒸留水 28. 5 m<sup>l</sup> の混合液] 30 m<sup>l</sup> を添加し、充分混和してから氷水中に 15 分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4°C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム = 1 : 1 混合液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で 5 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に 2 倍量のエタノールを加え、-20°C で 1 時間静置後、4°C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、沈殿を回収した。

【0066】沈殿を減圧乾燥後、TE 緩衝液 [トリス 10 mM, EDTA 1 mM; HCl にて pH 8.0 に調整] 2 m<sup>l</sup> に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5 倍濃度の TE 緩衝液 100 m<sup>l</sup> に塩化セシウム 170 g を溶解させた液] 15 m<sup>l</sup> と 10 mg/m<sup>l</sup> エチジウムプロマイド溶液 1 m<sup>l</sup> を加えて、密度を 1.392 g/m<sup>l</sup> に合わせた。この溶液を 12°C で 42 時間、11

6,000×gの遠心分離を行った。

【0067】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20°C 1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

#### 【0068】

##### (B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37°C 1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XbaI(1unit)を37°Cで30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0069】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65°Cで10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16°Cで15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0070】形質転換株は30μg/ml(最終濃度)のカナマイシン、100μg/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)100μg/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1リットル、pH7.2)で37°Cにて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照]により抽出した。

【0071】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kb

のDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

#### 【0072】参考例4

##### プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

参考例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-AK 5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5units用い、37°Cで1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンク (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mMMgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ結合させた。

【0073】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37°Cで1時間反応させ分解したものと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37°Cで1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSG5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解)に塗抹した。

【0074】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0075】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリングを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mMSucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離してを集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーン

パルサー（バイオラド社製）を用いて、2500ボルト、 $25\mu$ FDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン $15\mu$ g/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施

例3（A）項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

#### 【0076】

#### 【表3】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XbaI	1	10.4
EcoRI	2	1.7, 8.7
XbaI	2	3.4, 7.0
SphI	3	1.7, 2.1, 6.6
PstI	4	0.4, 1.7, 3.3, 5.0

【0077】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、微研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

#### 【0078】実施例1

#### プレビバクテリウム・フラバムMJ233のAEC耐性変異株の取得

##### 1) AEC耐性株の分離

培地（尿素0.4%、硫安1.4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg/l、ビオチン $20\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン塩酸塩 $100\mu\text{g}/\text{l}$ 、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）50mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌し、pH7に調節した後、プレビバクテリウム・フラバムMJ233を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行なった。

【0079】菌体を回収し、TMバッファー（Tris 24.2g/l、マレイン酸23.2g/lの液を25mlと0.2N NaOH 15mlを混合し、100mlにメスアップする）5mlで1回洗浄を行なった。 $\text{N}-\text{メチル-N}'-\text{ニトロ-N}-\text{ニトログアニジン}$  30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む上記TMバッファーに菌を懸滴し、30℃で2時間インキュベートした。

【0080】この菌体処理液を上記培地（カザミノ酸、酵母エキスを除く）にて2回洗浄したのち、AEC 10g/lを含有する平板培地（尿素0.2%、硫安0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{NaCl}$  2ppm、ビオチン $200\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン・HCl 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）10mlを24φ試験管に分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後上記1)項で得たAEC耐性を有するプレビバクテリウム・フラバ

ム $\text{mg}/\text{l}$ 、ローピオチン $200\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン塩酸塩 $100\mu\text{g}/\text{l}$ 、寒天 $20\text{g}/\text{l}$ 、グルコース2%（滅菌後添加）]に塗抹し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離した。

【0081】次に生じたコロニーを100mlの上記培地を用いて培養し、集菌後2回洗浄し、L-リジンの定量を行なった。L-リジンの定量は、高速液体クロマトグラフィー（島津LC-5A）を用いて行なった。この結果、AEC耐性株中にL-リジンの生成量が、野生型に比べて著しく増大した株が存在し、これを次のとおり命名した。

【0082】プレビバクテリウム・フラバムMJ233-Leu-AEC-Lys163 (FERM P-13512)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys84 (FERMP-13511)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys242 (FERMP-13513)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys40 (FERMP-13510)。

【0083】上記した各菌株は、茨城県つくば市東1丁目1番1号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。これらの菌株を以下の実験に用いた。

#### 【0084】

##### 2) AEC耐性株のアスパルトキナーゼ活性の測定

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{NaCl}$  2ppm、ビオチン $200\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン・HCl 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）10mlを24φ試験管に分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後上記1)項で得たAEC耐性を有するプレビバクテリウム・フラバ

ム (*Brevibacterium flavum*) を各々植菌し、無菌的にグルコースを 5 g / l の濃度になるように加え、30℃にて 2 日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地 (グルコース 5%、硫酸アンモニウム 2.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  20 ppm、ビオチン 200  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、チアミン・HCl 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、カザミノ酸 0.1%、酵母エキス 0.3%) の 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注、滅菌 (120℃、20 分間) 後、前記前培養物の 1 ml を添加して温度 33℃にて 24 時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物 100 ml から遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて洗浄した菌体を 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で 1 回洗浄後、同緩衝液を 2 ml 添加し、ガラスピーブル 1 g を加えた。超音波にて菌体を破碎した後、12,000 rpm、40 分間遠心し上清を得た。アスパルトキナーゼ活性を測定する反応液 [アスパラギン酸カリウム (pH 8) 10.5 mM、ATP 20 mM、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0 mM、Tris-HCl (pH 8) 100 mM、ヒドロキシルアミン 600 mM] に調製した上清 0.1 ml を加え全体を 1 ml にしたのち、37℃で 1 時間反応させた。これに 2.5 ml の呈色液 [5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と、12% TCA と 3N HCl を等量混合したもの] を添加し、遠心後上清の 540 nm の吸光度を測定した。

【0087】反応液にスレオニン (Thr)、リジン (Lys) をまったく無添加のときの値を 100 とし、これに対する Thr、Lys をそれぞれ 100 mM、200 mM 添加したときの割合を、脱感作度と定義した。野生型の株のアスパルトキナーゼの脱感作度は 0% であるのに対し、変異株 MJ 233-Leu-AEC-Lys 163、MJ 233-AEC-Lys 84、MJ 233-AEC-Lys 40 ではそれぞれ 70%、50%、80%、40% であった。すなわち AEC 耐性の変異株 1、2、3、4、では、アスパルトキナーゼが Lys、Thr に対するフィードバックインヒビションが解除されていることが確認された。

#### 【0088】実施例 2

##### フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の単離および同定

実施例 1 で得られた各菌株を同様の培地で培養し以下の方法で染色体 DNA を回収した。

【0089】得られた菌体を 10 mg/ml の濃度にリゾチームを含む 10 mM NaCl - 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) - 1 mM EDTA - 2 N a 液 1.5 ml に懸濁した。次にプロテナーゼ K を、最終濃度が

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、37℃で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃で 6 時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール／クロロホルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 × g、20 分間、10 ~ 12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに 10 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) - 1 mM EDTA - 2 N a 液 5 ml を加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0090】次に、上記で各菌株から得られた染色体DNAを制限酵素 Eco RI、Nru I 各 10 units で完全に分解し、プラスミド pUC119 を制限酵素 Eco RI、Sma I 各 2 units で切断したものを各々混合し、50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.6)、10 mM DTT、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し 12℃で 16 時間反応させ結合させた。

【0091】得られた各プラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology 53, 159, 1970) により、前記アスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリ CGSC 5074 (thr A1101, lys C1001, met L1000) [( ] 内はアスパルトキナーゼ遺伝子型 (genotype) を示す) を各々形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, グルコース 20 g, 寒天 16 g, 1 リットルにメスアップ) に各々塗抹した。生育してきた各コロニーを AEC 5 g/l を含む同選択培地に各々塗抹し、AEC 耐性であることを確認した。

【0092】この各々の培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より各プラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により各々切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pUC119 の長さ 3.2 kb の DNA 断片に加え、長さ約 1.7 kb の插入 DNA 断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約 1.7 kb の DNA 断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、各変異株から得られたものとも同種であり、前記表 1 に示したとおりであった。

【0093】また上記で得た MJ 233-Leu-AEC-Lys 163 より得られた 1.7 kb の DNA 断片が導入されたプラスミド (プラスミド pUC119-AK835) を各種制限酵素で切断して、切断断片の大き

さを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0094】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4. 9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3. 6, 1. 2

【0095】なお、他変異株から得られた1. 7 kbのDNA断片が導入された各プラスミドの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは表4に示したものと同様であった。

【0096】実施例3

フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例2で得られたフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法, Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Res. USA., 74, 5463, 1977)により決定した。

【0097】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子は、後記配列表の配列番号2～5に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263塩基対より構成されていることが判明した。その配列は、野生型のアスパルトキナーゼ配列(配列番号1)と比べて、835番目のGがAに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからThrに変化したもの(配列番号2)、836番目のCがTに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからValに変化したもの(配列番号3)、902番目のCがTに変異することにより301番目のアミノ酸がSerからPheに変化したもの(配列番号4)、923番目のCがTに変異することにより308番目のアミノ酸がThrからIleに変化したもの(配列番号5)であることがわかった。

【0098】実施例4

サイトダイレクトミュータジエネシスによる人為的フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の作成

野生型アスパルトキナーゼ遺伝子がpUC119にクローニングされたプラスミドpUC119-AK(参考例1)を用いて下記の方法にて変異を導入した。

【0099】まず、pUC119-AKを含むエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)にM13KO7ファージ(宝酒造製)を感染させて常法に従い1本鎖DNAを作製した。この1本鎖DNAと、pUC119を95℃、5分間加熱し急冷したものを混合し、アニーリング

【表4】

させることにより、野生型アスパルトキナーゼ遺伝子部分が1本鎖でベクター部分が2本鎖である分子を形成させた。

【0100】これに実施例3で見い出した変異部分を中心含む25merの1本鎖合成DNAを4種類作製しそれぞれ混合した。さらにDNAポリメラーゼによりギャップを修復したのち、それぞれ、実施例1で使用したアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリCGSC5074株に導入し、AEC10g/1を含む前記選択培地に塗抹した。

【0101】生じたコロニーよりそれぞれプラスミドを抽出し、実施例3と同様の方法で塩基配列を決定したところ、それぞれ配列番号2～5に示した配列と全く同様の配列を有していた。

【0102】実施例5

プラスミドpCRY30-AK835の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例2で得られたプラスミドpUC119-AK835 5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンクー(宝酒造より市販)1μlを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0103】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g, グルコース 20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0104】この培地上の生育株を常法により液体培養

し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6 kbのDNA断片に加え、大きさ1.7 kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0105】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mLの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mLになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mLのパルス用溶液(272mM sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分

離して集め、5mLのパルス用溶液に懸濁し、0.75mLの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μLとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンバルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mLの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/mL(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表5に示す。

【0106】

【表5】

表5 プラスミドpCRY30-AK835		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XbaI	1	10.4
EcoRI	2	1.7, 8.7
XbaI	2	3.4, 7.0
SphI	3	1.7, 2.1, 6.6
PstI	4	0.4, 1.7, 3.3, 5.0

【0107】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AK835と命名した。なお、プラスミドpCRY30-AK835により形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AK835は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号: FERM P-13508として寄託されている。

【0108】実施例6

#### L-リジンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2ppm、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 2ppm、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/1、チアミン・HCl 100μg/1、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%) 10mLを500mL容三角フラスコに分注、滅菌(滅菌後pH 7.0)した後プレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum) MJ233-AK835

(FERM P-13508号)を植菌し、無菌的にグルコースを5g/Lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0109】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸

アンモニウム2.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20ppm、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 20ppm、ビオチン200μg/1、チアミン・HCl 100μg/1、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mLを2リットル容通気搅拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の20mLを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH 7.6にて24時間培養を行った。

【0110】培養終了後、培養物500mLから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20ppm; MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/1; pH 7.6]の1000mLに懸濁後、該懸濁液を2リットル容通気搅拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH 7.6にて24時間反応を行った。

【0111】反応終了後、遠心分離(4000rpm、15分間、4℃)にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。この反応終了後の培養液500mLを、強酸性陽イオン交換樹脂(H<sup>+</sup>型)のカラムに通してL-リ

ジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。

【0112】また、比較例として、同様の条件にて、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM B P-1497) およびブレビバクテリウム・フラバム

J233-AK (FERM P-12658) を培養し、同様の条件にて反応させた後にL-リジンを定量し、同様の条件にてL-リジンの結晶を得た。それらの結果を表6に示す。

【0113】

【表6】

表6

菌株	プラスミド	L-リジン生成量	結晶析出量
MJ233-AK835	pCRY30-AK835	8.0 g/l	2000 mg
MJ233-AK	pCRY30-AK	1.5 g/l	400 mg
MJ233	---	0.6 g/l	120 mg

【0114】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: P

【0115】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CGG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160

TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT CTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
                  165                 170                 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
                  180                 185                 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
                  195                 200                 205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
                  210                 215                 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
                  225                 230                 235                 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
                  245                 250                 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
                  260                 265                 270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
                  275                 280                 285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
                  290                 295                 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
                  305                 310                 315                 320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
                  325                 330                 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
                  340                 345                 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
                  355                 360                 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
                  370                 375                 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
                  385                 390                 395                 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
                  405                 410                 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
                  420

【0116】配列番号：2

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-Leu-AEC-Lys163

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0117】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG ACT GCG  
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15  
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Ala  
20 25 30  
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45  
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60  
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80  
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
85 90 95  
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
100 105 110  
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
115 120 125  
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
130 135 140  
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CCC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
145 150 155 160  
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
165 170 175  
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
180 185 190  
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
195 200 205  
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
210 215 220

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225                    230                    235                    240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245                    250                    255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTC ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275                    280                    285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290                    295                    300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305                    310                    315                    320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325                    330                    335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340                    345                    350  
 CGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355                    360                    365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370                    375                    380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385                    390                    395                    400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405                    410                    415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0118】配列番号：3

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys84

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0119】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1                    5                    10                    15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GGC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG CGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160  
 TTG GCA GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 TCC GAT AAG CCA GCC GAG GTT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Val Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0120】配列番号：4

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys242

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0121】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
                       85                     90                     95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
                      100                    105                    110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
                      115                    120                    125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
                      130                    135                    140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
                      145                    150                    155                    160  
 TTG GCA GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
                      165                    170                    175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
                      180                    185                    190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
                      195                    200                    205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
                      210                    215                    220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
                      225                    230                    235                    240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
                      245                    250                    255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
                      260                    265                    270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
                      275                    280                    285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TTC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Phe Ser Val Glu  
                      290                    295                    300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
                      305                    310                    315                    320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
                      325                    330                    335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

340	345	350
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr		
405	410	415
GCA GGC ACC GGA CGC Ala Gly Thr Gly Arg		
420		

【0122】配列番号：5

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys40

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0123】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala		
1	5	10
15		
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Ala		
20	25	30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp		
35	40	45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg		
50	55	60
65		
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu		
70	75	80
85		
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr		
90	95	
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg		
100	105	110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly		
115	120	125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg		

130	135	140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CCC CGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA		
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
145	150	155
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT		
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
165	170	175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG		
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
180	185	190
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC		
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
195	200	205
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT		
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
210	215	220
GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG		
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
225	230	235
ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC		
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
245	250	255
GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTC ACC GTT CTG GGT ATT		
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
260	265	270
TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT		
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
275	280	285
GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA		
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu		
290	295	300
GAC GGC ACC ATC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC		
Asp Gly Thr Ile Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
305	310	315
CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC		
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
325	330	335
AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG		
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		
340	345	350
GCC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG		
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC		
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA		
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT		

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
                   405                         410                         415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
                   420

[0 1 2 4] 配列番号 : 6

配列の長さ : 1263

## 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

### トポロジー：直鎖状

### 配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

### 特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1-1263

### 特徴を決定した方法：E

他の情報：835 番目のR はG またはA を示し、836 番目、902 番目および923 番目のY はC またはT を示し、同時に、835 番目のR がG であり、836 番目、902 番目および923 番目のY がC であることはない。

[0125]

配列

TGCCCCCTGG	TCGTACAGAA	ATATGGCGGT	TCCTCGCTTG	AGAGTCCGGA	ACGCATTAGA	60
AACGTCGCTG	AACGGATCGT	TGCCACCAAG	AAGGCTGGAA	ATAATGTCTG	GGTTGTCTGC	120
TCCGCAATGG	GAGACACCAC	GGATGAGCTT	CTAGAACATTG	CTGCGGCAGT	GAATCCCCTT	180
CCGCCAGCTC	CTGAAATGGA	TATGCTCCTG	ACTGCTGGTG	AGCGTATTTC	TAACGCTCTC	240
GTCGCCATGG	CTATTGAGTC	OCTGGGTGCA	GAGGCTCAAT	CTTTCAOGGG	TTCTCAGGCT	300
GGTGTGCTCA	CCACCGAGCG	TCACGGAAAC	GCACGGATTG	TTGATGTAC	TOCAGGTCTG	360
GTGCGTGAAG	CACTCGATGA	GGGCAAGATC	TGCATTGTTG	CTGGTTTCCA	GGGTGTCAAT	420
AAGGAAACCC	GCGATGTCAC	CAOGTTGGGT	CCCGGTTGGTT	CTGATACACAC	TGCAGTTGCA	480
TTGGCAGCTG	CTCTGAACGC	TGATGTGTGT	GAGATTACT	CAGATGTTGA	CGGGCGTGTAC	540
ACCGCTGACC	CGCGCATCGT	TCCTAATGCT	CAGAAGCTGG	AAAAGCTCAG	CTTCGAAGAA	600
ATGCTGGAAC	TTGCTGCTGT	TGGCTCCAAG	ATTTTGGTGC	TACGCAGTGT	TGAATACGCT	660
CGTGCATTCA	ATGTGCCACT	TCGGGTACGC	TGGTCTTATA	GCAATGATCC	CGGCACTTG	720
ATTGCCGGCT	CTATGGAGGA	TATTCTGTG	GAAGAAGCAG	TCCTTACCGG	TGTCGCAACC	780
GACAAGTCG	AAGCCAAAGT	AACCGTTCTG	GGTATTCCG	ATAAGCCAGG	CGAGRYTGCG	840
AAGGTTTCC	GTGCGTTGGC	TGATGCAGAA	ATCAACATTG	ACATGGTTCT	GCAGAACGTC	900
TYCTCTGTGG	AAGACGGCAC	CAYCGACATC	ACGTTCACCT	GCCCTCGCTC	TGACGGACGC	960
CGTGCAGATGG	AGATCTTGAA	GAAGCTTCAG	GTTCAAGGGCA	ACTGGACCAA	TGTGCTTAC	1020
GACGACCAGG	TCGGCAAAGT	CTCCCTCGTG	GGTGCAGGGCA	TGAAGTCTCA	CCCAGGTGTT	1080
ACCGCAGAGT	TCATGGAAGC	TCTGCGCGAT	GTCAACGTGA	ACATCGAATT	GATTTCCACC	1140
TCTGAGATCC	GCATTTCCGT	GCTGATCCGT	GAAGATGATC	TGGATGCTGC	TGCAOGTGCA	1200
CTGCATGAGC	AGTTCCAGCT	GGGCGGGCGAA	GACGAAGCCG	TCGTTTATGC	AGGCACCGGA	1260
CGC						1263

【0126】配列番号：7

配列の長さ : 421

### 配列の型：アミノ酸

### トポロジー：直鎖状

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名 : MJ233

## 配列の特徴

存在位置：1-421

## 特徴を決定した方法：田

他の情報：279 番目のAAA はAla またはThr またはVal を示し、301 番目のYYYはSer またはPhe を示し、308 番目のZZZ はThr またはIle を示し、同時に、279 番目のAAA がAla であり、301 番目のYYY がSer であり、308 番目のZZZがThr であることはない。

[0127]

## peptide

配列  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Ile Asn Val

20	25	30
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp		
35	40	45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg		
50	55	60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu		
65	70	75
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr		
85	90	95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg		
100	105	110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly		
115	120	125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg		
130	135	140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
145	150	155
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
165	170	175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
180	185	190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
195	200	205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
210	215	220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
225	230	235
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
245	250	255
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
260	265	270
Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
275	280	285
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu		
290	295	300
Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
305	310	315
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
325	330	335
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		
340	345	350
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
Leu His Glu Gln Phe Gin Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr		
405	410	415
Ala Gly Thr Gly Arg		

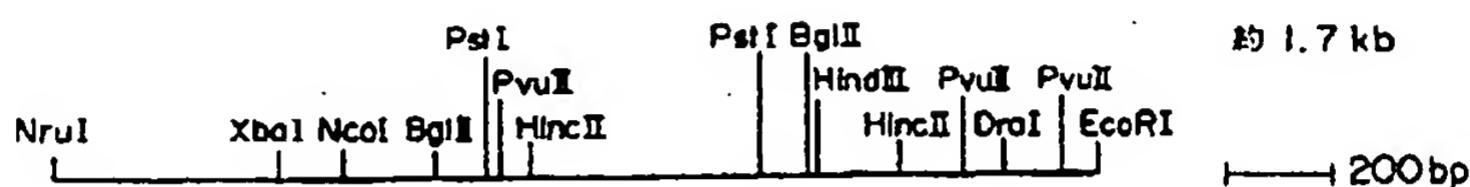
## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のレーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

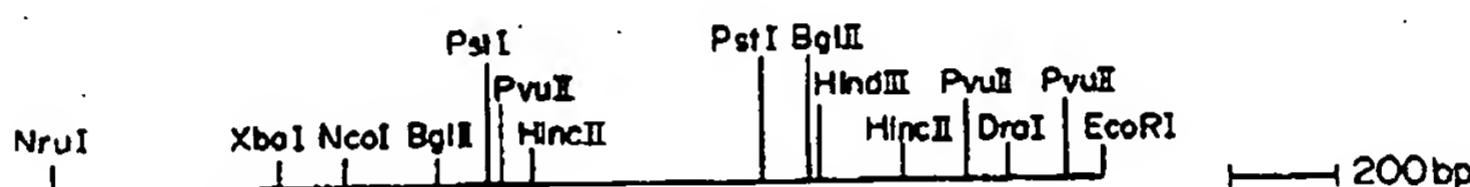
【図2】大きさが約1.7 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための概略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AK835の制限酵素切断点地図。

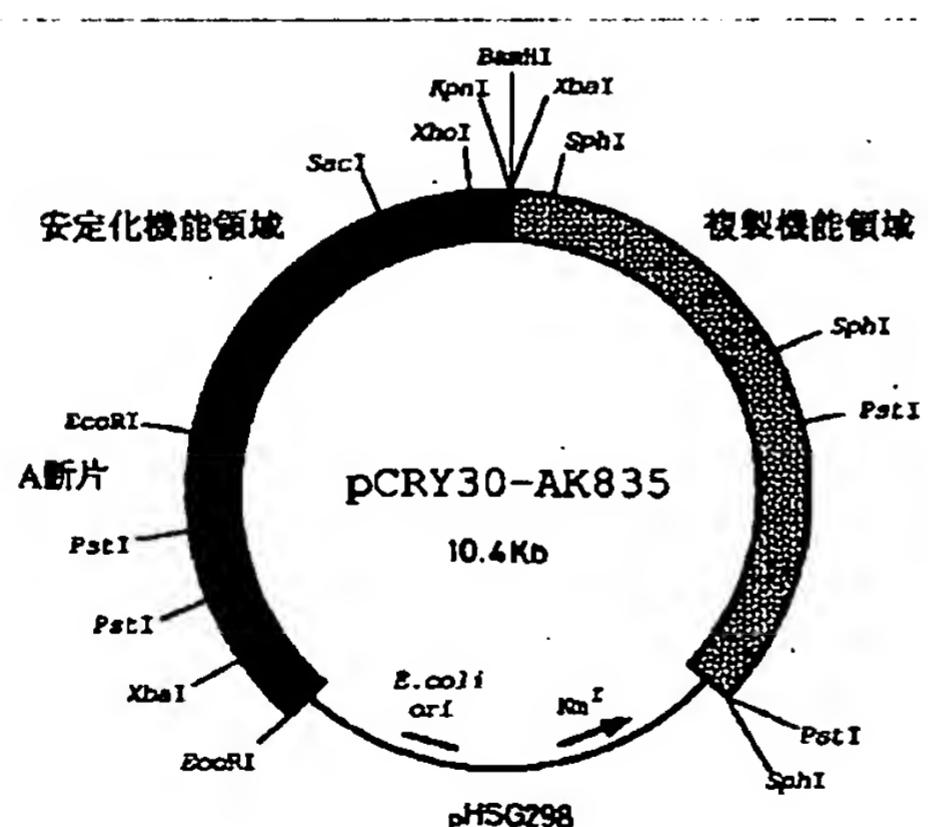
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

(C 12 P 13/08)

C 12 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

(72) 発明者 小浜 恵子  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 久留主 泰朗  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 湯川 英明  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内